

## 난소낭종 시 변화되는 세포사멸 관련 유전자

탁현민<sup>1,2</sup>, 김규태<sup>1</sup>, 김은진<sup>1</sup>, 문윤자<sup>1</sup>, 최창용<sup>3</sup>, 손동수<sup>3</sup>, 한재희<sup>1</sup>, 강다원<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>경상대학교 의학전문대학원 생리학교실, <sup>2</sup>진주산업대학교, <sup>3</sup>농촌진흥청 국립축산과학원 가축유전자원시험장

### Apoptosis-related Genes Altered in Bovine Cystic Ovary

Hyun-Min Tak<sup>1,2</sup>, Gyu-Tae Kim<sup>1</sup>, Eun-Jin Kim<sup>1</sup>, Yun-Ja Mun<sup>1</sup>, Changyong Choe<sup>3</sup>, Dong-Soo Son<sup>3</sup>, Jaehee Han<sup>1</sup> and Dawon Kang<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Physiology, School of Medicine and Institute of Health Sciences, Gyeongsang National University, Jinju 660-751, Korea

<sup>2</sup>Animal Resources Technology, College of Life Sciences and Natural Resources, Jinju National University, Jinju 660-758, Korea

<sup>3</sup>Animal Genetic Resources Station, National Institute of Animal Science, RDA, Namwon 590-832, Korea

### ABSTRACT

This study was carried out to investigate expression of apoptosis-related differentially expressed gene (DEG) in ovaries of Korean cattle with follicular and luteal cysts and to identify the relationship between cyst and apoptosis using microarray, real-time PCR, TUNEL staining, and Western blot analysis. Microarray data showed that PIK3R2 and AKT1 were significantly up-regulated in follicular cyst, and TNF-RAF2, PRLR, FOXL2, STK4, and COL4A3 were up-regulated whereas INHA, CIDEB, BCL10, and FASLG were down-regulated in luteal cyst. Real-time PCR was performed to validate DEGs altered in luteal cyst. Of nine DEGs, four DEGs down-regulated in luteal cyst showed a positive correlation between microarray data and real-time PCR data. In this study, we focused on INHA, among many DEGs, which was highly down-regulated in both follicular and luteal cysts. Real-time PCR and microarray data showed that INHA was down-regulated by 12.3-fold and by 1.4-fold, respectively, in the bovine follicular cyst. TUNEL assay and Western blot analysis for ERK, JNK, p38, PI3K, and Akt, which were used to detect whether apoptosis is occurred, showed no significant changes in cystic ovaries ( $p > 0.05$ ). In the expression and activity of caspase-3, Bax, Bcl-2, and Bcl-xL, there was no significant changes between follicular cystic ovary and normal ovary. Rather, the expression levels of PI3K and p-Akt were decreased in follicular cystic ovary. These results suggest that deficiency of apoptosis in cystic ovary is associated with decreased expression of apoptotic effectors.

(Key words : Korean cattle, microarray, follicular cyst, luteal cyst, apoptosis)

### 서 론

세포자멸사는 세포 항상성의 중요 기전 중 하나로 유전적으로 보존된 관련 유전자에 의해 조절되는 능동적인 세포 죽음 과정이다. 세포자멸사는 세포의 수축(shrinkage, apoptotic volume decrease, AVD), 세포막의 파괴, 염색체의 응축 등과 더불어 사멸체라는 포낭을 형성하고 형성된 세포 사멸체들은 세포 주위에 물려있는 큰 포식세포들에 의해 포식되어 세포 내 내용물들이 세포 밖 환경에 노출되지 않아 염증 반응이 나타나지 않는다(Clarke와 Clarke, 1995).

난포의 성장과 폐쇄에는 세포자멸사 과정이 동반된다. 난포 폐쇄에 대한 정확한 기전은 아직 알려져 있지 않지만 난포

의 과립층세포(granulosa cell) 자멸사는 난포폐쇄에 주된 역할을 하는 것으로 알려져 왔다(Hughes와 Gorospe, 1991; Hakuno 등, 1996). 폐쇄난포에서 나타나는 세포자멸사는 과립층세포와 난포막세포(theca cell)를 제거하기 위해 나타나는 현상으로 알려져 있다(Jolly 등, 1994; Isobe와 Yoshimura, 2000).

난포낭종과 황체낭종은 한우의 번식 장애 원인 중의 하나로 분류된다(최 등, 2006). 황체는 난소 주기의 변화를 초래할 수 있으므로, 황체가 연장되거나 배란이 지연되어 수태율에 영향을 미치게 된다(Lamming과 Darwash, 1998; 박 등, 2006). 황체는 과립층세포로 구성되어져 있기 때문에 과립층세포의 사멸에 의한 물과 이온들의 항상성 교란에 의한 낭종 생성을 간과할 수 없다. 황체기 동안, 황체는 인히빈(inhibin)을 만들어

\* 본 연구는 농촌진흥청 현장협력기술개발사업(과제번호: 20090101-080-057-001-00-00호)의 지원에 의해 이루어진 것임.

\* Correspondence : E-mail : dawon@gnu.ac.kr

난포자극호르몬(follicular stimulating hormone, FSH) 분비 작용을 억제하여 새로운 난포의 발생을 지연시키고 더 이상의 배란이 일어나지 않게 한다(Costanzo, 2006). 그러나 착상 및 임신 유지에 중요한 황체는 비정상적으로 성장하거나 강내로의 출혈 및 호르몬의 분비 이상으로 인해 낭성으로 변할 수 있다. 난포낭종에서의 과립층세포와 난포막세포의 증식은 퇴화되는 난포에서 보다 더 천천히 증식하였으며, 퇴화되는 난포에서 과립층세포와 난포막세포의 사멸이 증가하였다(Jakimiuk 등, 2001; Thornberry와 Lazebnik, 1998). 낭증이 진행됨에 따라 과립층세포의 자멸사로 과립층세포가 사라졌다(Thornberry와 Lazebnik, 1998). 난소 표면 상피세포 역시 Fas antigen/Fas ligand signaling을 통하여 세포자멸사를 겪는다(Margalit 등, 2005). 그러나 난소낭종 시 세포자멸사 현상의 보고는 여러 연구자들 사이에 상반된 결과를 도출하고 있다(Isobe와 Yoshimura, 2000a; Isobe와 Yoshimura, 2007; Peter와 Dhanasekaran, 2003).

과립층세포의 사멸에 따라 형성될 수 있는 난포낭종 및 황체낭종의 세포자멸사를 마이크로어레이(microarray, chip) 방법을 이용하여 2배 이상 변화되는 세포사멸 관련 유전자를 근거로 정상난소와 비교분석하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 재료 및 배양액

본 연구에 이용된 한우의 난소는 도축장으로부터 회수되어 저온 상태에서(4°C) 실험실로 운반되었다. 난소는 세절 없이 phosphate buffered saline(PBS)로 세척한 후 신속하게 2배 이상 부피의 *RNAlater*(Qiagen GmbH, Hilden, Germany)에 담가 4°C에서 12시간 이상 보관하였다. 준비된 시료에서 *RNAlater*를 제거한 후 -80°C로 옮겨 실험 시까지 보관하였다. 번식 장애의 유형은 도축장에서 회수된 난소의 형태학적 병리학적 소견을 근거하여 구분하였다(최 등, 2008).

### 2. 마이크로어레이 분석

난소로부터 RNA를 추출하여 cRNA를 합성하고 정제한 후, 표지된 cRNA 10~15 µg을 분절 용액(fragmentation buffer, Affymetrix Inc, CA, USA)을 이용하여 35 bp에서 200 bp까지 분절시켰다. 만들어진 cRNA, 분절 용액 및 RNA 분해효소가 없는 물(RNase free water)을 0.2 ml PCR tube에 넣고 94°C에서 35분간 반응을 유도하였다. 분절된 cRNA는 GeneChip® Bovine Genome Array Chips(Affymetrix)을 이용하여 제조사의 실험 과정에 따라 진행하였다. 어레이(array)들은 streptavidin-phycoerythrin complex를 가지고 염색한 후 GeneChip Operating Software(Affymetrix, CA, USA)로 강도를 조정하여 GeneChip scanner 3000(Affymetrix)을 이용하여 스캔하고 발현 패턴을 분석하였다. 마이크로어레이 분석의 전 과정은 서린 바

이오(an agency of Affymetrix Gene Chip, Seoul, South Korea)에 의뢰하였다.

### 3. 정량적 역전사중합효소중합반응(qRT-PCR)

Total RNA는 TRIzol(invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 정상, 난포낭종 및 황체낭종을 보이는 난소로부터 추출되었다. 추출된 total RNA는 Superscript preamplification system(Invitrogen)과 oligo(dT)를 이용하여 cDNA로 합성되었다. 합성된 cDNA는 소(bovine)에 특징적으로 작용하는 primer를 이용하여 증폭되었다(Table 1). 증폭산물은 염기서열 분석을 통하여 확인하였다. 각 유전자의 mRNA 발현량은 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)의 발현량으로 정량·비교 분석하였다.

### 4. 세포사멸 분석(TUNEL Staining)

세포사멸을 확인하기 위하여 *in situ* cell death detection kit (Roche, Mannheim, Germany)를 이용하여 Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling(TUNEL) 염색을 실시하였다. 4% paraformaldehyde로 고정된 세포를 PBS로 세척한 후 세포에 TUNEL reaction mixture의 침투를 용이하게 하기 위해 permeabilization 용액을 30분간 처리하고 15분간 PBS로 3회 세척하였다. 세척 후 TUNEL reaction mixture(TdT and Fluorescein-dUTP)를 처리하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 이때 양성대조군(positive control)은 DNase를 37°C에서 1시간 동안 처리한 후 TUNEL reaction mixture로 반응 시키고, 음성대조군(negative control)은 terminal transferase를 제외한 TUNEL reaction mixture로 반응시켰다. 이후 PBS로 15분간 3회 세척한 후 세포를 wet mounting하여 형광 현미경하에서 세포사멸을 관찰하였다.

### 5. 웨스턴블롯 분석(Western Blot Analysis)

난소낭종에서 세포사멸 신호 전달 경로에 관여하는 단백질들을 분석하기 위해 정상 및 낭종 조직을 PBS로 씻은 뒤 1.5 ml 튜브에 넣고 분해 용액(lysis buffer; RIPA buffer, Cell signaling technology, Danvers, MA, USA)을 넣어 분쇄하였다. 분쇄된 조직들은 4°C에서 30분간 배양된 후 13,000 rpm(16,609 × g, Micro 17TR, Hanil, Korea)에서 30분간(4°C) 원심분리되었다. 원심분리 후 상층액을 따서 새로운 1.5 ml 튜브로 옮기고 Bradford protein assay(Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 시약을 이용하여 정량하였다. 정량된 단백질 중 50~100 µg을 각 웰에 넣어 10% SDS-PAGE에서 전기영동한 후 polyvinylidene fluoride(PVDF) membrane(0.45 µm, Millipore, Bedford, MA, USA)에 전기영동한 단백질을 옮긴 후, blocking 용액(5% fat-free milk and 0.05% Tween20 in TBS), 1차 항체(Anti-ERK, -pERK, -Jnk, -pJnk, -p38, -pp38, -Bcl-xL, -Bax, -Bcl-2, -Ca

Table 1. Bovine-specific primer sequences used for real-time PCR

Gene symbol	GenBank accession Nos.	Primer sequences (5'-3')	Expected size (bp)
<i>TNF-RAF2</i>	XM_869007	Sense: CATCGCTACTGCTCCTTCTG Antisense: AGACGCCCTCCTCGTAAAT	95
<i>PRLR2</i>	NM_001039726	Sense: CATCAACCAGATGGGAATCA Antisense: TTCAAAGTCAGGTTTGCAG	97
<i>FOXL2</i>	NM_001031750	Sense: ACGAGTGCTTCATCAAGGTG Antisense: CCCTTCTCGAACATGTCCTC	94
<i>STK4</i>	NM_001015602	Sense: GTCATTGGGAATAACAGCCA Antisense: GGTGGGTTGGTAGGAATCAT	97
<i>COL4A3</i>	XM_618164	Sense: AAATGGATTGAAAGGGCAAC Antisense: TTCTCCAGGAAATCCTGACC	99
<i>INHA</i>	NM_174094	Sense: GGAGGGCCTCTTCACGTAT Antisense: GTCTGTCCAGTCCCTGTGTGG	97
<i>CIDBE</i>	NM_001034567	Sense: CAGCCTGAATATCAAAGCCA Antisense: GGAGGAGCTCCCTGAGTATTT	98
<i>BCL10</i>	NM_001078028	Sense: TGATGGAGCCACAAATAACC Antisense: TCTCCTTCTGGGTGATACATGA	99
<i>FASLG</i>	NM_001098859	Sense: GAGTTGGCTGAACTCAGAGAGTC Antisense: TTCTCAGAGGGTGGACTGG	92

spase-3, -PI3K, -Akt 및 -pAkt; Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA), 2차 항체(Sigma, St Louis, MO, USA)를 처리하고 membrane을 세척한 후 암실에서 enhanced chemiluminescence (ECL Plus kitELPIS, Taejeon, Korea)을 이용하여 특정 단백질을 증폭시켜 단백 존재를 확인하였다. 각 단백질의 발현량은 actin의 발현량으로 정량·비교 분석하였다.

6. 통계학적 분석 및 실험 성적의 처리

실험 결과의 통계학적 분석은 Student's *t*-test를 이용하여 처리구간의 유의성을 검정하였고( $p < 0.05$ ), 결과들은 평균±표준편차로 표시하였다.

결 과

1. 난소낭종에서 변화되는 세포사멸 관련 유전자

Table 2와 3은 한우의 난포낭종 및 황체낭종에서 변화되는 세포사멸관련 유전자를 정상 조직과 비교한 bovine array 분석 결과이다. 정상에 비해 난포낭종 및 황체낭종 어레이에서 증가(up)/감소(down)하는 세포사멸 관련 유전자를 유전자 존재론(Gene ontology) 정보 분석을 통하여 정리하였다(www.godatabase.org). 세포 사멸 관련 유전자 중 2배 이상 변화되는

유전자(differentially expressed genes; DEG)를 의미 있는 유전자로 간주하여(log 2=1) 보여주고 있다. 난포낭종에서는 전체 1,852개 유전자 중 934개가 증가하고 918개가 감소하였으며, 증가하는 934개 유전자 중 세포사멸과 관련된 유전자는 5개(2개의 DEG를 포함해서 cytochrome C, Apo-2 ligand 및 inhibin alpha(INHA))였다. 두개의 DEG는 phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 2(p85 beta)(PIK3R2)와 v-akt murine thymoma viral oncogene homology 1(AKT1)이다(Table 2). 난포낭종에서는 감소 DEG는 확인되지 않았다. 황체낭종에서는 2,771개 유전자 중 1,789개가 증가하고 982개가 감소하였는데, 1,789개의 증가 유전자 중 세포 사멸 관련 유전자 14개가 확인되었으며, DEG 5개가 포함되어있다. 감소하는 세포사멸관련유전자는 12개가 확인되었으며, DEG가 4개 포함되어 있다. 황체낭종에서 증가되는 세포사멸 관련 DEG에는 TNF receptor-associated factor 2 유사유전자(TNF-RAF2), prolactin receptor(PRLR), forkhead box L2(FOXL2), serine/threonine kinase 4(STK4) 및 collagen type IV, alpha 3(Goodpasture antigen, COL4A3)가 포함되고, 감소하는 DEG에는 inhibin, alpha (INHA), cell death activator CIDE-B(cell death-inducing DFFA- like effector B, CIDEB), B-cell CLL/lymphoma 10 (BCL10) 및 Fas ligand(FASLG)가 포함된다.

Table 2. Apoptosis-related genes up-regulated in cystic ovary

Gene name (Gene symbol)	GenBank accession Nos.	Fold change (log2)	Reproductive disorders
<i>Similar to TNF receptor-associated factor 2 (TNF-RAF2)</i>	XM_869007	5.6	Luteal cyst
<i>Prolactin receptor (PRLR)</i>	NM_001039726	5.0	Luteal cyst
<i>Forkhead box L2 (FOXL2)</i>	NM_001031750	3.5	Luteal cyst
<i>Serine/threonine kinase 4 (STK4)</i>	NM_001015602	3.2	Luteal cyst
<i>Collagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture antigen, COL4A3)</i>	XM_618164	2.9	Luteal cyst
<i>Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 2 (p85 beta) (PIK3R2)</i>	NM_174576	4.9	Follicular cyst
<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1 (AKT1)</i>	NM_173986	2.1	Follicular cyst

Table 3. Apoptosis-related genes down-regulated in luteal cyst

Gene name (Gene symbol)	GenBank accession Nos.	Fold change (log2)
<i>Inhibin, alpha (INHA)</i>	NM_174094	-2.7
<i>Similar to cell death activator CIDE-B (Cell death-inducing DFFA-like effector B) (CIDEB)</i>	NM_001034567	-2.3
<i>B-cell CLL/lymphoma 10 (BCL10)</i>	NM_001078028	-2.4
<i>Fas ligand (FASLG)</i>	NM_001098859	-2.2

## 2. 난소낭종에서 발현 변화를 보이는 DEG의 검증

황체낭종에서 검출된 DEG 9개를 정량적 역전사증합효소 반응을 이용하여 mRNA 발현 변화를 검증하였다. 마이크로어레이 분석에서 증가하는 DEG 5개(TNF-RAF2, PRLR, FOXL2, STK4 및 COL4A3)와 감소하는 DEG 4개(INHA, CIDEB, BCL10 및 FASLG)를 정량적 역전사 증합효소 반응으로 재확인한 결과, 증가하는 DEG 5개는 정량적 역전사 증합효소 반응에서는 모두 감소하였다. 감소하는 DEG 4개는 마이크로어레이와 정량적 역전사 증합효소 반응 결과 모두 일치하였다(Fig. 1). 그러나 변화율에는 다소 차이를 보였다. INHA의 경우 마이크로어레이 결과에서는 1.43배 감소하고 정량적 역전사 증합효소 반응 결과에서는 12.3배 감소하였다. 황체낭종에서 변화되는 DEG를 난포낭종 검체에서도 정량적 역전사 증합효소 방법을 이용하여 확인하였다. 정상난소에 비해 난포낭종에서 PRLR2, STK4 및 BCL10은 증가하고 TRAF, FOXL2, COL4A3, INHA, CIDEB 및 FASLG는 감소하였다( $n=3$ ,  $p<0.05$ , Fig. 1).

## 3. 세포사멸

세포사멸사 확인을 위하여 TUNEL 형광염색을 실시하였다. 자멸사가 일어난 세포는 DNA 절편화가 일어난 부위에 fluorescein isothiocyanate(FITC) 형광염색제가 염색되어 난포낭종과 황체낭종의 일부 세포가 초록색으로 나타났다( $n=4$ ,

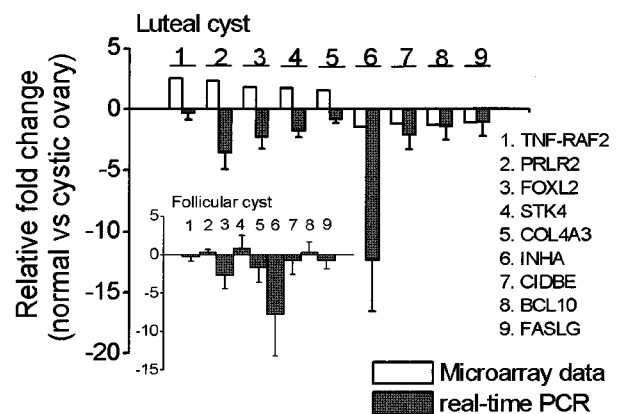


Fig. 1. Validation of DEGs by real-time PCR. Bar graphs showed fold-change in relative mRNA expression of TNF-RAF2, PRLR2, FOXL2, STK4, COL4A3, INHA, CIDEB, BCL10, and FASLG in the cystic ovaries. The expression levels were normalized to GAPDH. Each bar is the mean $\pm$ SD of three determinations.

Fig. 2). 그러나 황체낭종에서 초록색으로 염색된 세포의 일부는 핵부분이 염색되지 않은 것으로 보아 세포사멸에 의해 염색이 이루어진 것으로 보이지 않는다.

Fig. 3에서 보여지는 바와 같이 세포사멸의 분자적 기전을

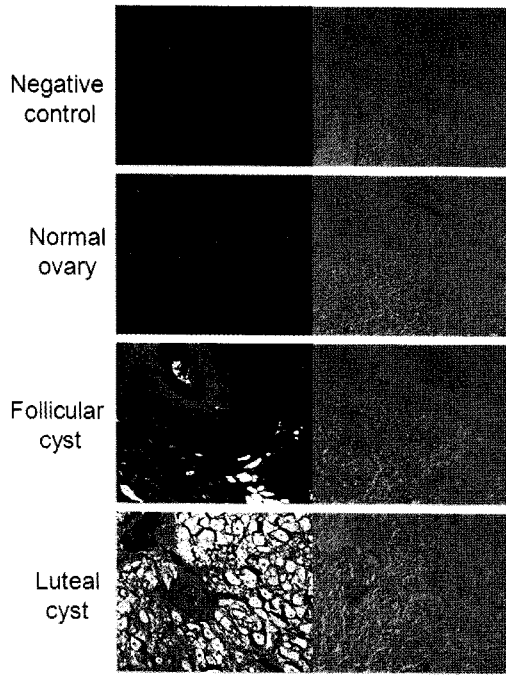


Fig. 2. Immunohistochemical data of bovine cystic ovaries. TUNEL staining was performed in follicular and luteal cystic ovaries. The signal was observed using confocal laser scanning microscopy (x 200).

밝히기 위하여 난포낭종과 황체낭종에서 mitogen-activated protein kinase(MAPK)의 활성 정도를 웨스턴 블랏 분석을 통해 확인하였다. Extracellular signal-regulated kinase(ERK), c-Jun NH2-terminal kinase(JNK) 및 p38의 단백질 발현을 비교해 본 결과 난포낭종에서 JNK의 발현이 나타나지 않는 것을 제외하고는 정상 난소와의 차이를 확인할 수 없었다. 난포낭종에 있어서 ERK의 활성이 다소 증가하는 것처럼 보였으나, JNK 및 p38의 활성화는 나타나지 않았다. 난포낭종과 황체낭종의 세포사멸에 있어서 caspase의 활성 역시 이루어지지 않았다. 미토콘드리아의 세포사멸 관련 단백질의 변화를 살펴보기 위해 대표적인 세포사멸 유발인자인 Bax의 저해 인자로 알려진 Bcl-2와 Bcl-xL을 단백질 분석을 통해 확인하였다. Bax, Bcl-2 및 Bcl-xL의 발현은 정상에 비하여 난소낭종에서 두드러진 변화를 보이지 않았다(n=3).

마이크로어레이 분석 결과, 난포낭종과 황체낭종 모두에서 PI3K와 Akt/PKB 유전자의 증가가 확인되었다(Fig. 4). PI3K와 Akt/PKB는 세포 생존에 관여하는 인자로서 잘 알려져 있다. 난포낭종에서 PI3K와 Akt의 발현 및 p-Akt의 활성화는 이루어지지 않았다. 오히려 PI3K와 p-Akt의 발현이 정상에 비하여 감소하였다(Fig. 3). 마이크로어레이 결과를 근거로 정리한 신호 전달 체계를 모식화하면 Fig. 4와 같다. mRNA와 단백질 분석 결과에서 보여진 난소낭종에서 나타나는 낮은 세포사멸

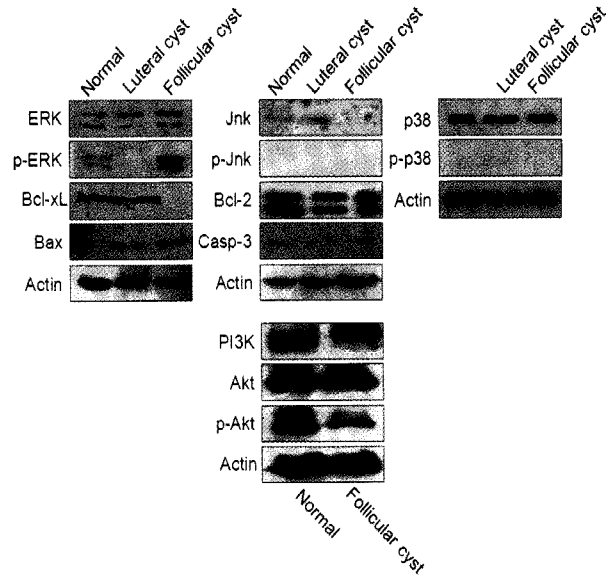


Fig. 3. Western blot analysis for apoptotic signaling involved in bovine follicular cysts. The expression levels were normalized to  $\beta$ -actin expression.

사는 세포사멸인자와 세포 생존 인자의 발현량과 활성도가 낮아 나타나는 것으로 생각된다.

### 고찰

본 연구에서는 난소낭종이 세포사멸과 어떠한 관련성이 있는지를 조사하고자 정상 난소, 난포낭종 및 황체낭종에서 유전자 수준 및 단백질 수준에서 세포사멸 관련 유전자의 발현 변화를 확인하였다. 본 실험 조건에서는 정상에 비해 난포낭종 및 황체낭종에서 유의한 세포사멸 현상이 확인되지 않았으며, 이러한 결과는 세포생존과 관련된 인자들과 세포사멸 관련 유전자의 발현 감소로 초래된 것이라 유추된다.

많은 연구자들은 난포의 폐쇄 과정 시 나타나는 세포사멸 사로부터 아이디어를 얻어 난포의 폐쇄, 난포낭종 및 세포사멸사간의 관계를 조사하였다. 난포의 폐쇄에 대한 정확한 기전은 아직 알려져 있지 않지만 난포의 과립층세포 사멸사가 난포 폐쇄에 주된 역할을 하는 것으로 보고하였다(Hughes와 Gorospe, 1991; Hakuno 등, 1996). 난소낭종은 발정 주기 동안 정해진 시간에 성숙 난자의 배란이 이루어지지 않아 나타나고(Peter, 2004), 시상하부-뇌하수체전연-생식샘의 연결 축에 있어서 호르몬 불균형이 나타나서 난소낭종이 형성되는 것으로 알려져 있다(Lopez-Diaz와 Bosu, 1992). 특히, 난포낭종 발생 시에는 성스테로이드 호르몬의 변화가 초래되는데 estradiol-17 $\beta$ 와 프로게스테론의 농도 사이에 음의 상관관계가 성립된다(Isobe와 Yoshimura, 2007). 테스토스테론의 농도는 난포낭종

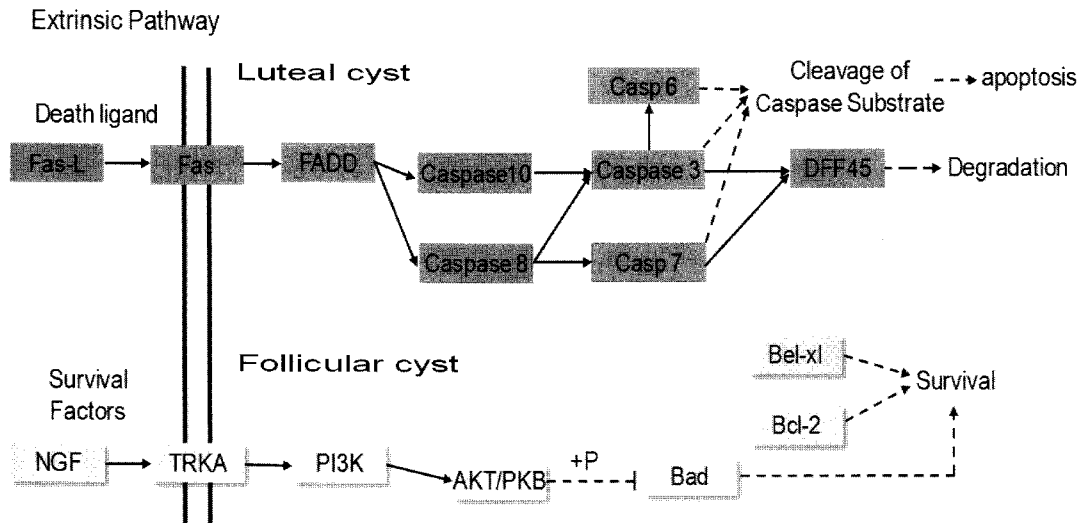


Fig. 4. Scheme of apoptosis-related signaling pathways, which are involved in follicular and luteal cystic ovaries, obtained from microarray, real-time PCR, and Western blot analysis. In the luteal cyst, down-regulation of FAS-ligand mRNA expression might be responsible for the decrease in apoptosis. There was a negative correlation between microarray data and Western blot analysis in the follicular cyst. Microarray data showed up-regulation of PI3K and AKT, whereas Western blot analysis showed down-regulation.

에서 유의하게 감소하였고 황체낭종의 난포액에서는 유의한 변화를 보이지 않았다(최 등, 2008). 낭종은 배란 장애 이후 난포의 퇴화가 지연되어 나타나는 현상이다. 건강한 난포에서는 과립층세포와 난포막세포가 계속적으로 증식하지만 폐쇄난포에서는 그 증식 정도가 감소된다(Garrett와 Guthrie, 1996). 폐쇄난포에서 나타나는 세포자멸사는 과립층세포와 난포막세포를 제거하기 위해 나타나는 현상으로 알려져 있다(Jolly 등, 1994; Isobe와 Yoshimura, 2000). 난포낭종이 있는 난포의 과립층세포와 난포막세포는 폐쇄난포에서 그들의 증식 정도보다는 훨씬 낮다(Isobe와 Yoshimura, 2000). 난포낭종 초기에는 난포가 과립층세포를 가지고 있고 이들 세포의 자멸사가 나타난다. 그러나 과립층세포를 가지지 않는 난포낭종 후기에도 세포자멸사는 여전히 나타난다(Isobe와 Yoshimura, 2000). 이러한 연구결과들은 과립층세포의 자멸사가 주된 난포낭종의 원인이 아님을 시사하였다. 난포낭종이 있는 난포의 난포막세포에서 proliferating cell nuclear antigen(PCNA)이 드물게 발현되고 과립층세포에서 caspase-3-positive 세포가 제한적으로 발현되었다. 난포낭종에서 과립층세포 자멸 정도가 낮고 난포막세포의 낮은 증식률로 난포들이 천천히 자라면서 퇴화 없이 일정한 수준까지 도달하여 유지되어 난포가 오랫동안 자멸사 없이 지속될 것이라고 생각하였다(Isobe와 Yoshimura, 2007). 현재까지 황체낭종에 있어서 세포자멸사에 관한 보고는 없다. 본 연구에 제시된 TUNEL 염색과 웨스턴 블랏 분석에 의해 보여진 결과들은 세포생존과 관련된 신호 및 세포자멸과 관련된 신호들의 정확한 발현이 확인되지 않아 세포자멸사를 강하게 증명할 수는 없다.

본 연구에서 조사된 유전자 중 마이크로어레이와 정량적 역전사 중합 효소 반응에서 동일한 결과를 보이면서 유의하게 변화된 INHA를 설명하고자 한다. 인히빈은 Bcl-2, Bax, FSH, FASLG 및 caspases 등과 함께 난포를 선택하는 분자로 구분되며(Elvin 등, 1999; Hussein, 2005) 난포기 전반에 걸쳐 발현한다. 그리고 에스트로겐이 억제된 난소에서 INHA의 발현 증가가 나타났으며, 이것은 태아 난소의 난포형성에 지장을 주었다(Billiar 등, 2003). 인히빈은 난포의 발달에 관여하고 세포사멸을 유도하며 세포주기를 정지시키기도 한다. 본 연구에서 조사된 세포자멸사 유도 유전자들, INHA, CIDEB, BCL10 및 FASLG의 발현 감소는 낭종에서의 세포자멸사 억제요인으로 작용할 수 있을 것 같다.

본 연구의 문제점 중 하나는 도축장으로부터 회수된 난소를 실험 재료로 사용하다보니 정확한 발정 주기의 확인이 되지 않은 난소를 실험에 사용하는 점이다. 이러한 문제점을 보충하기 위하여 면역 염색 또는 각 난포의 액으로부터 호르몬을 정량하여 비교하긴 하지만 충분한 해결은 이루어지지 않을 것 같다. 그리고 유전자 발현 변화가 황체기의 난소와 비교되지 못했다는 점이다. 황체기의 난소에서 변화되는 유전자로 알려진 것들은 insulin-like growth factor-binding protein 1 (IGFBP- rP1)이 있는데, 발정 주기 동안은 일정하게 유지되고 황체퇴화에 중요한 역할을 하는 황체 후기 조직에서 1.8배 증가하였다. Squalene epoxidase는 발정 주기 동안 황체 조직에서 지속적으로 발현되었고, 황체 후기 조직에서는 7배 감소하였다(Casey 등, 2004). 황체를 퇴화시키는 프로스타글란딘 (PGF<sub>2</sub> α)은 4일째의 황체에서 G-단백(guanine nucleotide bin-

*ding protein, G protein*)과 베타 폴리펩타이드 1(*beta polypeptide 1, GNB1*)의 발현을 증가시켰고, 10일째 칼슘/칼모둘린 의존성 카이네이즈 카이네이즈 2 베타(*calcium/calmodulin dependent kinase kinase 2, beta, CAMKK2*)를 증가시켰다(Goravannahally 등, 2009). 이렇게 시간에 따른 황체조직의 변화는 유전자들의 변화를 초래하고 유전자들의 변화는 또 다른 변화를 자극할 수 있을 것이다. 본 연구에서는 이러한 부분이 배제되었다. 본 연구의 결과는 난소낭종과 세포사멸사를 충분히 설명할 수는 없지만 난소낭종 시 극적인 세포사멸현상은 나타나지 않는 것으로 보이며 부분적으로 나타나는 세포사멸 현상은 세포 생존인자의 발현 및 활성의 감소로 나타나는 것이라 추정한다.

## 적 요

본 연구는 한우의 난포낭종 및 황체낭종에서 세포사멸사 관련 유전자의 발현 변화를 조사함으로써 난소낭종과 세포사멸사간의 관계를 정리하고자 한다. 마이크로어레이 분석 결과, 난포낭종에서 PIK3R2와 AKT1가 유의하게 증가하였고, 황체낭종에서는 증가되는 세포사멸사 관련 DEGs, TNF-RAF2, PRLR, FOXL2, STK4 및 COL4A3와 감소하는 DEGs, INHA, CIDEB, BCL10 및 FASLG가 포함되었다. 정량적 역전사 중합효소 반응을 이용하여 mRNA 발현 변화를 검증한 결과 INHA, CIDEB, BCL10 및 FASLG만 마이크로어레이와 동일한 결과를 보였다. INHA의 경우 마이크로어레이 결과에서는 1.43배 감소하고 정량적 역전사 중합효소 반응 결과에서는 12.3배 감소하였다. 세포사멸 확인을 위하여 TUNEL 형광염색과 ERK, JNK, p38, PI3K 및 Akt/PKB의 웨스턴 블랏 분석을 실시한 결과 정상난소와의 유의한 차이를 확인할 수 없었다. Caspase의 활성 및 Bax, Bcl-2, Bcl-xL의 단백질 분석 역시 정상난소와 유의한 차이를 보이지 않았다. 오히려 PI3K와 p-Akt의 발현이 정상에 비하여 감소하는 경향을 보였다. 이러한 결과들로 미루어 보아 난소낭종 시 볼 수 있는 세포사멸사의 낮은 발현율은 세포사멸인자의 발현 감소로 나타날 수 있을 것이라 생각된다.

## 참고문헌

- Billiar RB, Zachos NC, Burch MG, Albrecht ED and Pepe GJ. 2003. Up-regulation of alpha-inhibin expression in the fetal ovary of estrogensuppressed baboons is associated with impaired fetal ovarian folliculogenesis. *Biol. Reprod.* 68:1989-1996.
- Casey OM, Fitzpatrick R, McInerney JO, Morris DG, Powell R and Sreenan JM. 2004. Analysis of gene expression in the bovine corpus luteum through generation and characterisation of 960 ESTs. *Biochimica et Biophysica.* 1679: 10-17.
- Clarke PG and Clarke S. 1995. Historic apoptosis. *Nature* 378 (6554):230.
- Costanzo LS. 2006. *Physiology*, 3e. Elsevier Inc.
- Elvin JA, Yan C, Wang P, Nishimori K and Matzuk MM. 1999. Molecular characterization of the follicle defects in the growth differentiation factor 9-deficient ovary. *Mol Endocrinol.* 13:1018-1034.
- Garrett WM and Guthrie HD. 1996. Expression of androgen receptors and steroidogenic enzymes in relation to follicular growth and atresia following ovulation in pigs. *Biol. Reprod.* 55:949-955.
- Goravannahally MP, Salem Mohamed, Yao Jianbo, Inskip EK, and Flores Jorge A. 2009. Differential gene expression in the bovine corpus luteum during transition from early to mid-phase and its potential role in acquisition of luteolytic sensitivity to prostaglandin F<sub>2</sub> Alpha. *Biol. Reprod.* in press.
- Hakuno N, Koji T, Yano T, Kobayashi N, Tsutsumi O, Taketani Y and Nakane PK. 1996. Fas/APO-1/CD95 system as a mediator granulosa cell apoptosis in ovarian follicle atresia. *Endocrinology* 137:1938-1948.
- Hughes FM and Gorospe WC. 1991. Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. *Endocrinology* 129:2415-2422.
- Hussein MR. 2005. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Human Reproduction Update.* 11:162-178.
- Isobe N and Yoshimura Y. 2000. Immunocytochemical study of cell proliferation in the cystic ovarian follicles in cows. *Theriogenology* 54:1159-1169.
- Isobe N and Yoshimura Y. 2000a. Localization of apoptotic cells in the cystic ovarian follicles of cows: a DNA-end labeling histochemical study. *Theriogenology* 53:897-904.
- Isobe N and Yoshimura Y. 2007. Deficient proliferation and apoptosis in the granulosa and theca interna cells of the bovine cystic follicle. *Journal of Reproduction and Development* 53:1119-1124.
- Jakimiuk AJ, Weitsman SR, Navab A and Magoffin DA. 2001. Luteinizing hormone receptor, steroidogenesis acute regulatory protein and steroidogenic enzyme messenger ribonucleic acids are overexpressed in thecal and granulosa cells from polycystic ovaries. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86:1318-1323.
- Jolly PD, Tisdall DJ, Heath DA, Lun S and McNatty KP.

1994. Apoptosis in bovine granulosa cells in relation to steroid synthesis, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response to follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone and follicular atresia. *Biol Reprod* 51:934-944.
- Lamming GE and Darwash AO. 1998. The use of milk progesterone profiles to characterise components of subfertility in milked dairy cows. *Anim Reprod Sci.* 52:175-190.
- Lopez-Diaz MC and Bosu TK. 1992. A review and an update of cystic ovarian degeneration in ruminants. *Theriogenology* 37:1163-1183.
- Margalit KA, Cowan RG, Harman RM and Quirk SM. 2005. Apoptosis of bovine ovarian surface epithelial cells by Fas antigen/Fas ligand signaling. *Reproduction* 130:751-758.
- Peter AT and Dhanasekaran N. 2003. Apoptosis of granulosa cells: a review on the role of MAPK-signalling modules. *Reprod. Domest. Anim.* 38:209-213.
- Peter AT. 2004. An update on cystic ovarian degeneration in cattle. *Reprod. Domest. Anim.* 39:1-7.
- Thornberry NA and Lazebnik Y. 1998. Caspases: Enemies within. *Science* 281:1312-1316.
- 박수봉, 손준규, 박성재, 백광수, 전병순, 안병식, 김현섭, 박춘근. 2006. 젖소의 분만 후 비정상적 난소 주기가 번식 성적에 미치는 영향. *Reprod. Dev. Biol.* 30:213-218.
- 최창용, 손동수, 조상래, 김현중, 최선호, 강다원. 2008. 번식 장애 한우의 혈액요소태질소 및 성 스테로이드 호르몬 농도 변화. *J. Emb. Trans.* 23(1):59-64.
- 최창용, 손동수, 최규찬, 최창열, 최선호, 김현중, 조상래, 허창기, 강다원. 2006. 한우 번식우 사육 농가의 번식 장애 실태 조사. *J. Emb. Trans.* 21(4):331-338.

---

(접수일: 2009. 2. 23 / 채택일: 2009. 3. 6)